UČESTALOST I ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST URINARNIH IZOLATA *ESCHERICHIA COLI* I *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KOJI PRODUKUJU β -LAKTAMAZE PROŠIRENOG SPEKTRA KOD VANBOLNIČKIH PACIJENATA

INCIDENCE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* AND
KLEBSIELLA PNEUMONIAE URINARY ISOLATES PRODUCING EXTENDED
SPECTRUM β -LACTAMASES IN OUTPATIENTS

Tatjana Marković, Ljiljana Jeinić*, Duško Vasić†, Miroslav Petković

Sažetak. Stalna izloženost bakterija velikom broju β -laktamskih antibiotika dovela je do pojave novih tipova β -laktamaza, poznatih kao β -laktamaze proširenog spektra. Ove β -laktamaze proširenog spektra, najčešće proizvode *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, ali ih mogu proizvoditi i druge bakterije. Izolati bakterija koji proizvode β -laktamaze proširenog spektra, a koji, najčešće uzrokuju infekcije urinarnog trakta u bolničkoj populaciji, danas se sve češće otkrivaju i kod vanbolničkih pacijenata. Od 01. juna do 30. septembra 2006. godine bakteriološki je ispitano 5.376 uzorka urina ambulantnih pacijenata u Mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za zaštitu zdravlja Republike Srbije. Utvrđeno je 1.388 slučajeva značajne bakteriurije. *Escherichia coli*, kao najčešći uzročnik, utvrđena je u 739 urina (53,24%), a *Klebsiella pneumoniae* je utvrđena u 107 urina (7,71%). Identifikovano je 35 (4,74%) izolata *Escherichia coli* i 23 (21,50%) izolata *Klebsiella pneumoniae* koji su proizvodili β -laktamaze proširenog spektra. Praćenje izolata bakterija koji proizvode β -laktamaze proširenog spektra, i u bolničkoj i u vanbolničkoj populaciji, kao i testiranje njihove antimikrobne osjetljivosti, predstavlja osnovne mjere kontrole širenja ovih izolata i sprečavanja infekcija urinarnog trakta koje se otežano liječe.

Ključne riječi: β -laktamaze proširenog spektra, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*

Uvod

β -laktamski antibiotici (penicilini, cefalosporini, monobaktami i karbapenemi) spadaju u najčešće propisivane antibiotike širom svijeta. Produkcija β -laktamaza jedan je od mehanizama rezistencije koje bakterije koriste kako bi se suprotstavile antibiotskoj terapiji.

β -laktamaze su bakterijski enzimi koji hidrolizom β -laktamskog prstena inaktiviraju ove antibiotike [1]. Stalna izloženost bakterija β -laktamskim antibioticima dovela je do pojave tačkastih mutacija gena odgovornih za produkciju

β -laktamaza (TEM i SHV) i proširivanja spektra njihovog djelovanja na cefalosporine treće i četvrte generacije [2]. Novi tipovi β -laktamaza su prvi put opisani 1983. godine u Njemačkoj i definisani kao β -laktamaze proširenog spektra (*engl.*, *Extended Spectrum β -Lactamases*, *ESBLs*). To su enzimi koji hidrolizuju treću i četvrtu generaciju cefalosporina (ceftazidim, cefotaksim, cefepim) i monobaktame (aztreonam), ali su neaktivni na cefamicine (cefoksitin, cefotetan) ili karbapeneme (meropenem, imipenem) [3]. Ove enzime uglavnom proizvode *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) i

Escherichia coli (*E.coli*), iako ih mogu proizvoditi i druge bakterije, kao što su *Salmonella spp.* i druge *Enterobacteriaceae*, te *Pseudomonas aeruginosa*.

Sposobnost produkcije ESBL je kodirana genima plazmida, što omogućava relativno brzo prenošenje ove osobine sa jedne bakterije na drugu. Obzirom da se geni odgovorni za neke druge mehanizme rezistencije često nalaze na istom plazmidu, kao i geni za ESBL, produkcija ESBL je uglavnom povezana sa pojavom višestruke rezistencije [4]. Tako izolati koji proizvode ESBL, često pokazuju rezistenciju na hinolone, aminoglikozide i trimetoprim-sulfametoksazol, što otežava terapiju infekcija [5].

Učestalost ESBL varira geografski i raste sa vremenom. U SAD incidenca za *Enterobacteriaceae* se kreće od 0% do 25%, u Evropi od 23% do 25% za *Klebsiella spp.* i 5,4% za *E.coli* [6], u Hrvatskoj 2% za *E. coli* i 18% za *K.pneumoniae* [7].

Većina dostupnih podataka odnosi se na prevalencu ESBL proizvodećih izolata bolničkih pacijenata. Skraćivanje trajanja hospitalizacije, primjena terapije ambulantno i primjena hirurških procedura, koje zahtijevaju kraće vrijeme oporavka u bolnici, doveli su do brisanja oštre granice između bolničkih i vanbolničkih pacijenata i samim tim do pojave pomjeranja rezistencije u bolničkim sredinama, ka sve većoj pojavi rezistentnih izolata u vanbolničkim uslovima, odnosno u ambulantama.

Kasnih 90. godina i početkom novog milenijuma, *Enterobacteriaceae*, uglavnom *E. coli*, koje proizvode novije ESBL (CTX-M enzimi) izoluju se u sve većem broju iz urina ambulantnih pacijenata [3].

S obzirom da nema objavljenih podataka o ESBL proizvodećim izolatima najčešćih uzročnika infekcija urinarnog trakta za Republiku Srpsku, cilj studije je bio da se utvrdi prevalenca ESBL proizvodećih izolata *E.coli* i *K.pneumoniae* u urinu ambulantnih pacijenata sa značajnom bakteriurijom, kao i njihova osjetljivost na ostale antibiotike.

Materijal i metode

U četvoromjesečnom periodu (od 01. juna do 30. septembra 2006. godine) u Mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za zaštitu zdravlja Republike Srpske ukupno je bakteriološki ispitano 5.376 uzorka urina ambulantnih pacijenata. Uzorci urina su dobijeni metodom mikcije. Značajnom bakteriurijom smatran je broj bakterija $\geq 10^5$ u 1 mL urina. Nakon primarne kultivacije na krvnom i Endo agaru, izolati

koji su porasli u broju $\geq 10^5$ u 1 mL urina dalje su obrađivani.

Identifikacija do nivoa vrste i osjetljivost na antimikrobne lijekove rađena je na aparatu VITEK TWO Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), koji predstavlja automatski sistem za brzu fenotipsku identifikaciju bakterija i gljiva, kao i za brzo određivanje osjetljivosti na antibiotike. Osjetljivost na antibiotike zasniva se na određivanju minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) za pojedine lijekove. Korišćene su kartice za identifikaciju Gram negativnih bakterija (GN) i kartice za ispitivanje osjetljivosti Gram negativnih bakterija AST N019 za izolate iz urina. Uz očitavanje identifikacije, na osnovu fenotipa iz baze podataka, VITEK TWO Compact nudi i podatke o mehanizmu rezistencije ispitivanog soja.

Za ESBL pozitivne izolate praćena je osjetljivost na gentamicin i amikacin iz grupe aminoglikozida, norfloksacin i ciprofloksacin iz grupe hinolona, na trimetoprim-sulfametoksazol, na imipenem iz grupe karbapenema i uroantiseptik nitrofurantoin.

Rezultati

U četvoromjesečnog periodu (od 01. juna do 30. septembra 2006. godine) u Mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za zaštitu zdravlja Republike Srpske ukupno je ispitivano 5.376 urina, a u 1.388 uzoraka utvrđena je značajna bakteriurija. *E.coli*, kao najčešći uzročnik, je bila u 739 urina (53,24%), a *K.pneumoniae* je izolovana iz 107 urina (7,71%).

Identifikovano je 35 (4,74%) izolata *E.coli* i 23 (21,50%) soja *K.pneumoniae*, koji su proizveli β -laktamaze proširenog spektra.

Većina izolata *E.coli* je pokazala visoku rezistenciju na gentamicin (25/35, 71,43%) i amikacin (22/35, 62,86%) (tabela 1). Manje je izražena rezistencija na hinolone: norfloksacin i ciprofloksacin (4/35, 11,43%). Samo dva soja *E.coli* su pokazala osjetljivost na sve ispitivane antibiotike. Rezistenciju na dva i više ispitivanih antibiotika pokazalo je 29 (82,86%) izolata. Svi ESBL proizvodeći izolati *E. coli* pokazali su osjetljivost na imipenem i nitrofurantoin.

Svi izolati *K.pneumoniae* su bili rezistentni na gentamicin (23/23, 100%). Rezistenciju na dva i više ispitivanih antibiotika pokazalo je 20 (86,96%) izolata. Svi izolati ESBL pozitivne *K.pneumoniae* bili su osjetljivi na imipenem.

Tabela 1. Rezistencija izolovanih izolata *E.coli* i *K.pneumoniae* na ne- β -laktamske antimikrobne lijekove

Antimikrobni lijek	<i>E.coli</i> n (%)	<i>K.pneumoniae</i> n (%)
Gentamicin	25 (71,43)	23 (100)
Amikacin	22 (62,86)	14 (60,87)
Norfloksacin	4 (11,43)	9 (39,13)
Ciprofloksacin	4 (11,43)	9 (39,13)
Trimetoprim-sulfametoksazol	10 (28,57)	11 (47,83)
Imipenem	0 (0)	0 (0)
Nitrofurantoin	0 (0)	9 (39,13)

Diskusija

Infekcije izazvane bakterijama koje proizvode β -laktamaze proširenog spektra postaju sve češći problem u terapiji vanbolničkih infekcija. Nedavno provedene studije ukazuju na problem pojave ESBL proizvodeće *E.coli*, kao uzročnika infekcija urinarnog trakta u vanbolničkoj populaciji u Kanadi, Francuskoj, Izraelu, Španiji, Italiji i Engleskoj [8].

Prema rezultatima ispitivanja koje je ovdje prikazano, 4,74% urinarnih izolata *E.coli* i 21,50% urinarnih izolata *K.pneumoniae* proizvode β -laktamaze proširenog spektra.

Podaci iz dostupne literature o učestalosti ESBL proizvodećih izolata variraju u zavisnosti od geografskog područja. Opisana je zastupljenost ESBL proizvodeće *E.coli* kao uzročnika UTI od 1,4% do 10,5% [8].

U Hrvatskoj je taj procenat nešto niži i za *E.coli* iznosi 2% a za *K.pneumoniae* 18% [7], dok je u Srbiji za *E.coli* 1,92% [9]. U Palestini 3,3% izolata *E.coli* su ESBL produktori [10]. U Indiji je procenat ESBL pozitivnih izolata *E.coli* daleko veći i iznosi 18,5%, dok je procenat za *K.pneumoniae* nešto viši od rezultata ispitivanja koje je prikazano u ovom radu i iznosi 25,6% [3].

Studija rađena u Grčkoj pokazuje 1,5% ESBL produktora *E.coli* i nijedan ESBL produktor *K.pneumoniae* [11].

Ovakve razlike mogle bi se objasniti različitom zastupljenošću faktora koji dovode do pojave ESBL proizvodećih izolata, a prema studiji iz Španije prepoznati su prethodna upotreba fluorohinolona, rekurentne urinarnе infekcije, prethodna hospitalizacija i dijabetes melitus [12]. U studiji

provedenoj u Izraelu, koja se odnosi na vanbolničku populaciju, navode se, pored pomenutih, kao uzroci i prethodno korišćenje cefalosporina druge i treće generacije [13], a to potvrđuju i druge studije [14,15].

Poznato je da plazmidi, koji su odgovorni za produkciju ESBL, često nose gene rezistencije na druge antibiotike, što objašnjava pojavu višestruke rezistencije. Ti plazmidi mogu da nose gene koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide i trimetoprim-sulfametoksazol. Sve je više objavljenih slučajeva smanjene osjetljivosti na hinolone kodirane plazmidima, koja je u vezi sa plazmidima posredovanom rezistencijom na cefalosporine [15].

ESBL proizvodeći izolati *E.coli* koji su prikazani u ovom radu pokazuju visoku rezistenciju na aminoglikozide (gentamicin 71,43%, amikacin 62,86%). Rezistencija na hinolone je dosta niža (11,43%), bez razlike za norfloksacin i ciprofloksacin, što hinolone svrstava u lijekove koji se, još uvijek, u velikom broju slučajeva, mogu primjenjivati u terapiji urinarnih infekcija izazvanih ESBL proizvodećim izolatima *E.coli*.

Studija provedena u Gazi daje podatke o nešto višoj rezistenciji na gentamicin (81,80%), ali značajno nižoj na amikacin (9,1%) u odnosu na ovdje prikazane rezultate [10]. Rezistencija na ciprofloksacin u pomenutoj studiji iznosila je 54,50%. Studija rađena na Tajlandu pokazuje rezistenciju na gentamicin kod 67% izolata, a na norfloksacin kod 50% [8].

Svi izolati ESBL proizvodeće *K.pneumoniae*, prema ovdje prikazanim rezultatima, su rezistentni na gentamicin (100%), dok rezistencija na amikacin iznosi 60,87%. Rezistencija na hinolone (39,13%) izraženija je nego kod *E.coli* (11,43%). Velik je procenat izolata rezistentan i na trimetoprim-sulfametoksazol (47,83%). Nijedan soj nije bio rezistentan na imipenem, što ga čini izborom u terapiji urinarnih infekcija izazvanih ESBL pozitivnom *K.pneumoniae*. Za razliku od *E.coli*, 39,13% izolata *K.pneumoniae* pokazalo je rezistenciju na nitrofurantoin.

Razlike u antimikrobnoj rezistenciji koje se javljaju u pojedinim studijama mogu proisticati iz različitog perioda prikupljanja podataka. Isto tako, ispitivane populacije se mogu razlikovati u demografskim, ekonomskim, epidemiološkim i kliničkim karakteristikama.

Istraživanja *in vivo* pokazuju da se najbolji ishod terapije za ESBL produkujuće izolate *E.coli* i *K.pneumoniae* postiže primjenom karbapenema (imipenem, meropenem) [16,15], što potvrđuju i rezultati ispitivanja koje je ovdje prikazano.

Zaključci

Infekcije urinarnog trakta izazvane izolatima bakterija koji produkuju β -laktamaze proširenog spektra utvrđene su i u vanbolničkoj populaciji.

β -laktamaze proširenog spektra produkuje 4,74% izolata *E.coli* i 21,50% izolata *K.pneumoniae* izolovanih iz urina.

ESBL produkujući izolati pokazuju istovremeno rezistenciju i na nekoliko drugih grupa antibiotika. Utvrđena je visoka rezistencija na aminoglikozide.

Praćenje ESBL produkujućih izolata bakterija i u bolničkoj i u vanbolničkoj populaciji, testiranje njihove osjetljivosti, kao i sprečavanje neracionalne upotrebe antimikrobnih lijekova predstavlja osnovne mjere za kontrolu širenja ovih izolata.

Literatura

1. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1085-9.
2. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. Br Med J. 2003; 327: 1209-13.
3. Supriya ST, Suresh VJ, Sarfraz A, Umesh H. Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. Indian J Med Res. 2004; 120: 553-6.
4. Bradford P, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K. Multiply resistant Klebsiella pneumoniae from two Chicago hospitals: identification of the extended spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime hydrolyzing beta-lactamases in a single isolate. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 761-6.
5. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis. 2000; 30: 473-8.
6. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 933-51.
7. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2001. godini. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2002.
8. Tunyapanit W, Pruekprasert P. Extended-spectrum Beta-lactamases in Escherichia coli Isolated from Patients with Community-acquired Urinary Tract Infection at Songklanagarind Hospital, Thailand. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2006; 23: 51-6.
9. Stefanović S, Pavlović Lj, Dacić S, Mirović V, Stamenković M. Učestalost bakterijskih uzročnika infekcija urinarnog trakta i njihova osjetljivost na antibiotike. V kongres medicinske mikrobiologije; 2006 Jun 21-24; Beograd. Beograd: Udruženje medicinskih mikrobiologa Srbije, 2006.
10. Astal Z, Sharif FA, Abdallah SA, Fahd MI. Extended spectrum β -lactamases in Escherichia coli isolated from community-acquired urinary tract infections in the Gaza Strip, Palestine. Ann Saudi Med. 2004; 24: 55-7.
11. Skandami-Epitropaki V, Chimona A, Xanthaki A, Tsiringa A, Milioti T, Toutouza M. Frequency and antimicrobial susceptibility of extended spectrum beta-lactamase producing urinary isolates. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2006 April 1-4; Nice, France.
12. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Nonhospitalized Patients. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1089-94.
13. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, et al. Risk factors for development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23: 163-7.
14. Calbo E, Romani V, Xercavins M, Gomez L, Vidal CG, Quintana S, et al. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to Escherichia coli harbouring extended-spectrum beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 780-3.
15. Peterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta-lactamases: a Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18: 657-86.
16. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. N Engl J Med 2005; 352: 380-91.

Summary. Permanent exposure of bacteria to a large number of β -lactam antibiotics has led to occurrence of new types of β -lactamases, known as extended spectrum β -lactamases. These extended spectrum β -lactamases are most often produced by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, but also by other bacteria. The bacteria isolates producing extended spectrum β -lactamases, which, most often, cause urinary tract infections within the hospital population, today are more and more often discovered in outpatients too. From 1 June to 30 September 2006, there were bacteriologically examined 5,376 urine samples from the outpatient department patients in the Microbiology laboratory of the Institute for Health Protection of the Republic of Srpska. There were established 1,388 cases of significant bacteriuria. *Escherichia coli*, being the most often cause, was established in 739 urine samples (53.24%), and *Klebsiella pneumoniae* in 107 urine samples (7.71%). There were identified 35 (4.74%) isolates of *Escherichia coli* and 23 (21.50%) isolates of *Klebsiella pneumoniae*, which were producing extended spectrum β -lactamases. Monitoring of bacteria isolates producing extended spectrum β -lactamases, both in hospital and community, as well as testing of their antimicrobial susceptibility, present basic measures in control of these isolates spreading and prevention of the urinary tract infections, which are quite difficult to treat.

Key words: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Extended spectrum β -lactamases

Tatjana Marković, Miroslav Petković

Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Banja Luka

*Ljiljana Jeinić

Mikrobiološka laboratorija, Institut za zaštitu zdravlja Republike Srpske

†Duško Vasić

Odjeljenje za urologiju, Opšta bolnica "Sveti apostol Luka", Doboj